

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 8 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26293292

研究課題名(和文) 胸腺若年再生による前臨床大動物での免疫寛容誘導新戦略：宿主骨髄と胸腺外因子の役割

研究課題名(英文) Induction of tolerance by rejuvenation of thymus in preclinical large animal model.

研究代表者

昇 修治 (Nobori, Shuji)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：30433288

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,400,000円

研究成果の概要(和文)：これまでの研究結果から、胸腺の若年化ならびに移植免疫寛容には若年骨髄が重要な働きを示し、胸腺でのIGF1R発現がそのマーカーとなりえることが示唆された。平成28年度は、コントロールとして加齢ブタ胸腺の加齢ブタへの移植ならびに若年、加齢ブタの胸腺での末梢血清IGF値の加齢による変化を検討した。2頭に加齢ブタに移植された加齢胸腺は退縮が著しく、1頭はその胸腺に拒絶を示す細胞浸潤ならびに抗ドナー反応を呈した。更に血清IGFの加齢による変化に関しては、IGFが加齢により減少していくことが確認された。

研究成果の概要(英文)：Our previous study suggested that rejuvenation of thymus and bone marrow from juvenile donors have important role of inducing transplant tolerance. Expression of IGF1R in thymus can be the marker of transplant tolerance. However, the important question remained whether aged, involuted thymus could also induce tolerance. We tested the IGF level in aged swine thymus after transplantation of aged thymus from aged donor. It showed rejection in aged thymus and sensitization against the donor.

研究分野：移植免疫

キーワード：移植・再生 前臨床研究 免疫寛容 胸腺 ミニブタ

1. 研究開始当初の背景

移植免疫寛容誘導における MHC 確立大動物実験の必要性と本申請における重要性重症臓器不全の根治治療として確立した臓器移植医療であるが、移植臓器機能の維持には永続的な免疫抑制剤の服用が必要であり、医療費の増大、薬剤による副作用、悪性腫瘍発生率の増加、更に免疫抑制剤の服用にもかかわらず慢性拒絶反応を完全には制御し得ないという問題を伴う。

これらに対する究極的解決策として、免疫寛容誘導に関する研究成果が、マウス・ラットを用いた小動物モデルにより報告されている。小動物実験は大動物に比べ廉価であり、メカニズムの解明に重要な MHC 確立ならびに遺伝子操作が可能であるという優位性を有する反面、多く結果は大動物モデルで再現性が得られないという問題を有する。一方、最近の米国の臨床腎移植の免疫寛容誘導報告 5 症例においても、慢性期に拒絶または抗ドナー抗体を有した状態が続く症例を認め、永続的な免疫寛容誘導については長期観察が必要である。これらの事象は、臓器移植免疫寛容誘導のメカニズム解明及び治療法の確立には、大動物を用いた前臨床実験が非常に重要であることを示唆する。霊長類(サル)の実験はヒトに最も近い種を用いた前臨床実験と位置づけられるが、MHC の検討は個々の個体検査によるもので、群として一定の実験群を組むことは難しい。本実験は、免疫寛容誘導における胸腺と骨髄の役割を検討するものであるが、そのためには同一 MHC の個体を実験群として構成する必要がある。遺伝背景の確立という小動物の優位性を兼ね備えた MHC 確立ミニブタは、前臨床実験と位置づけられる本実験に必須かつ最適な実験動物である。

胸腺の加齢に関する申請者の研究と課題

我々は、加齢または胸腺摘出若年ミニブタは免疫寛容が困難である (Yamada K. J Exp Med 1997 Transplantation 1999) という現象を基に、移植免疫寛容誘導における胸腺の役割を前臨床大動物ミニブタモデルで検討し、加齢退縮した胸腺の若返りにより胸腺固有の能力が再生し、免疫寛容誘導が可能になるという独創的及び新規的な仮説にたち、これまでに、(1)ミニブタ胸腺は、加齢に伴い皮質の割合が髄質に比し低下し退縮すること、(2)加齢退縮した胸腺を MHC 適合若年宿主に移植することで、胸腺の構築が若年胸腺と同様な構築へ若返ること (Nobori S. PNAS 2006) (3) LH-RH アゴニスト投与により加齢退縮したブタ胸腺が若年化すること (Hirakata A, Yamada K. Transplant Immunol 2010) を報告した。これらの結果は、胸腺の加齢退縮は、胸腺内局所因子 (intrinsic factor) より、宿主の外因子 (extrinsic factor) により優位に支配されていることを明確に示すものである一方、胸腺の若年化における宿主骨髄細胞の関与は明らかではなかった。

加齢因子が移植成績に及ぼす影響と申請者の研究：加齢レシピエントでは、若いレシピエントより移植腎生着日数が短く、レシピエントの加齢が移植成績悪化の危険因子であることが示唆されている (Pascher A. Ann Transplant 2004) 我々は、胸腺の加齢に伴う退縮に着目し、(1)若年ミニブタでは、MHC 部分不適合間腎移植で短期免疫抑制療法により免疫寛容が得られるが、加齢ミニブタでは移植腎が拒絶されること (Yamada K. Transplantation 1999) (2)若年ミニブタで術前に胸腺を摘出すると、加齢ブタと同様に免疫寛容が誘導されないこと (Yamada K. JEM 1997) (3)若年ドナー胸腺を、胸腺を摘出した宿主に移植することで、移植腎の免疫寛容が誘導される

こと (Yamada K. J Immunol 2000) を報告してきた。これらの結果は、若年胸腺が免疫寛容能を持つものの、加齢により免疫寛容誘導能が損なわれることを示し、臨床移植医療での免疫寛容誘導療法を確立するうえで、胸腺を含めたレシピエントの加齢因子の研究の重要性を示している。

2. 研究の目的

胸腺は、T 細胞の分化と、分化過程での抗原への反応性による T 細胞選択・教育機能を有する。我々は前臨床大動物ミニブタを用い、移植免疫寛容誘導における胸腺の役割を検討し、加齢または胸腺摘出若年レシピエントは免疫寛容誘導が困難であることを基に、加齢退縮した胸腺の若返りによる胸腺固有能力の再生が免疫寛容に繋がるという仮説を立て、若年宿主への加齢退縮胸腺の移植による胸腺構築の若返りや、LH-RH アゴニスト投与による加齢退縮胸腺の若年化を報告した。これらの結果は、胸腺の加齢退縮は、胸腺内局所因子より、宿主の外因子が優位に支配することを示唆しているが、胸腺の若年化における宿主骨髓細胞の関与は明らかでなかった。更に最近の実験は、加齢に伴う免疫誘導能の低下への末梢メモリー細胞の関与が示唆されている。そこで本研究では、主要組織適合性抗原 MHC 確立ミニブタを用い、宿主骨髓が胸腺の若年/退縮過程に果たす役割と胸腺主導性免疫寛容誘導機序の解明 (目的 1) 加齢宿主での免疫寛容誘導に対する胸腺若年化および宿主骨髓の中枢性若年化の必要性を明らかにする (目的 2)。

目的 1) 宿主骨髓が胸腺の若年/退縮過程に果たす役割と胸腺主導性免疫寛容誘導機序の解明：我々は、(1) ブタ胸腺は加齢により委縮し、胸腺皮質の割合が髓質に比

し低下 (皮質 < 髓質) すること (図 1)、(2) 分担者山田が確立した胸腺血管茎付移植法 (VTL 法) で若年宿主に加齢胸腺を移植すると、胸腺が若年化 (皮質 > 髓質) すること、(3) LH-RH アゴニスト投与により、加齢退縮胸腺が若年化することを確認している (図 2)。これらの結果は、胸腺外の因子が胸腺の加齢を制御していることを示しているが、その因子がホルモン因子のみか骨髓細胞の関与があるかは明らかでない。そこで MHC 確立クラウンミニブタを用い、加齢ブタと若年ブタの胸腺ならびに骨髓の入れ替えを行い (次ページ Table 1 に詳述) 胸腺の若年/退縮過程における宿主骨髓の役割を検討し (目的 1-A)、また若年化胸腺のみで腎移植免疫寛容が誘導されるかを評価する (目的 1-B)。更に、末梢リンパ球・リンパ節・胸腺・骨髓の細胞解析や免疫制御機能を免疫組織学・分子生物学的に解析し、胸腺若年化・免疫寛容誘導能に関与する因子を明らかにする。目的 2) 加齢宿主の免疫誘導において、若年化胸腺のみで寛容誘導が可能か、宿主骨髓の中枢性若年化が必要かを明らかにする：我々は最近の実験で、胸腺若年化を目的とした加齢レシピエントへの LH-RH アゴニスト投与は、投与後 2-3 ヶ月の胸腺若年化維持するが、それに続く腎移植では、移植腎機能の延長は認められないという結果を得た (Nobori S, Yamada K. 論文製作中)。この結果は、免疫寛容には胸腺の若年化以外に、骨髓・末梢リンパ器官の若年化が必要であることを示唆し、目的 2 では、若年化胸腺のみで移植腎免疫寛容誘導が可能か、宿主骨髓の中枢性若年化とそれに伴う抹消リンパ組織の若年化も必要かを明らかにする。

3. 研究の方法

実験方法：加齢レシピエントの骨髄を、目的 1-A と同様の放射線療法後に MHC 適合の加齢または若年骨髄と入れ替え、骨髄移植 3 ヶ月後*に胸腺を VTL 法により MHC 適合の若年または加齢胸腺と入れ替える。目的 1-B と同様に胸腺の入れ替えと同時に MHC 不適合の腎臓を移植し、免疫寛容誘導能を検討する。

*骨髄移植 3 ヶ月後に胸腺の入れ替えを行う根拠：目的 2 では MHC 不適合移植腎への免疫反応の評価を目的とするため、骨髄移植時の放射線療法より減少する T/B 細胞の機能が正常に戻る 3 ヶ月後に腎移植を行う。これまでの準備実験で骨髄移植 3 ヶ月後までに、その免疫機能 (T/B 細胞数ならび細胞性・液性免疫反応) が完全に回復することを確認している。

腎機能・免疫学的評価：目的 1 と同様に、血清 Cre、腎臓生検、CFSE-MLR、PKH26-CML、抗ドナー抗体産生、Co-culture CML 試験による制御性 T 細胞機能を経時的に観察する。胸腺ならびに骨髄移植後の末梢 T 細胞分画と免疫反応の推移：目的 1 に準じ評価する。

4. 研究成果

これまで (平成 26 年度・27 年度) の研究成果として、若年骨髄が老年宿主に移植された若年胸腺の退縮を抑制すること、反面、若年宿主に移植された老年胸腺は若年化し (以下生理的若年化)、その若年化に妻子 IGF1R の胸腺内発現が増強すること、更に LHRH 薬剤投与による老年胸腺の若年化では、IGF1R が増強しないこと、生理的に若年化された胸腺は移植腎免疫寛容能を持つが、薬剤性若年胸腺は移植腎免疫寛容能を獲得できない結果が得られた。このことから、胸腺の若年化ならびに移植免疫寛容には若年骨髄が重要

な役割を示し、胸腺での IGF1R 発現がそのマーカーになりえることが示唆された。

平成 28 年度は、コントロールとして加齢ブタ胸腺の加齢ブタへの移植ならびに若年、加齢ブタの胸腺での末梢血清 IGF 値の加齢による変化を検討した。

胸腺の若年化ならびに移植免疫寛容には若年骨髄が重要な働きを示し、胸腺での IGF1R 発現がそのマーカーとなりえることを確かめた。

2 頭の加齢ブタに移植された加齢胸腺は退縮が著しく、1 頭はその胸腺に拒絶を示す細胞浸潤ならびに抗ドナー反応を呈した。更に血清 IGF の加齢による変化 (n=60) に関しては、IGF が加齢により減少していくことが確認された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

昇 修治 (Shuji Nobori)
京都府立医科大学
医学(系)研究科(研究院)
講師
研究者番号: 303433288

(2) 研究分担者

山田 和彦 (Kazuhiko Yamada)
鹿児島大学
医用ミニブタ・先端医療開発研究センター
学内共同利用施設等 教授
研究者番号: 40241103

佐原 寿史 (Hisashi Sahara)
鹿児島大学
医用ミニブタ・先端医療開発研究センター
学内共同利用施設等 准教授
研究者番号: 90452333

(3) 連携研究者

()

研究者番号:

(4) 研究協力者

()